

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590044

研究課題名（和文） ポリアミンによる分子修飾とその生理的意義の解明

研究課題名（英文） Analysis of Modification with polyamines and investigation of the physiological significance

研究代表者

白幡 晶（SHIRAHATA AKIRA）

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：50150107

研究成果の概要（和文）：

生体内に多量に存在するが、まだその詳細な役割については判明していないポリアミンに注目した。本研究課題では、（1）ポリアミンの分子修飾の可能性を調べたところ、細胞膜リン脂質間のアシル基転移反応の際、共存する生体アミンへの転移反応が副次的に進行する可能性が示された。さらに、（2）分子修飾ポリアミンが水溶性高分子モデル化合物の腸管吸収に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, polyamines that remain to be resolved for detailed roles, was focused to investigate novel cellular functions. The results illustrated that the transfer of polyamines to acyl group occurred during the acyl transfer reaction between cellular phospholipids. Additionally, polyamine-conjugated compounds were found to affect intestinal absorption of water-soluble big molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：ポリアミン、分子修飾、腸管吸収、アシル基転移反応、アシルスペルミン

1. 研究開始当初の背景

本研究は、ポリアミン分子の特異的な作用の解明を目指して、これまで系統的な研究が行われていないポリアミンによる分子修飾に焦点を当て、ポリアミンによる修飾分子の探索およびその機能解明を試みるものである。ポリアミンは、細胞増殖における必須因子として認識されているが、その生理作用の詳細は不明である(Pegg and Faith, *Biochem Soc Trans.* (2007) 35, 295)。哺乳動物細胞には、スペルミジンおよびスペルミジンから生じるスペルミン、さらに前駆体であるジアミンのプトレシンが存在し、それらの濃度は細胞機能に複雑に連動して変動する。また、ポリアミンを人為的に枯渇させることによって、細胞の増殖や分化過程は停止あるいは大きく影響を受け、ポリアミンが多くの特異的な分子に作用することで細胞機能をモジュレートしていることが推察されている。これまでの研究から、細胞内ポリアミンの作用はポリカチオン分子として核酸の安定化に働く比較的特異性の低い作用と、細胞増殖に必須のタンパクとして知られるeIF-5Aの翻訳後修飾基質にスペルミジンが働くなど、酵素反応が関与する特異性の高い作用に大別されている。比較的特異性の低い作用に関しては、ポリアミンによるタンパク合成促進作用などの観点から多くの研究成果が蓄積されているが、特異性の高い作用に関しては、eIF-5Aタンパクやトランスグルタミナーゼの基質として働く数例(Beninatti et al., *FEBS Lett.* (1998) 437, 34, Masuda et al., *EMBO J.*, (2000), 19, 521.)が報告されているにすぎない。

本研究室では、ポリアミンの消化酵素に対する影響を調べるうちに、セリンプロテアーゼなどによりペプチド結合の加水分解が進行する際、ポリアミンが切断ペプチドのC末端にアミノリシスによって修飾されることを *in vitro* 実験において見いだした(Ito et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007) 356, 159)。このことは、生体内で多くの酵素反応が進行する際、細胞内に常に比較的高濃度で存在するポリアミンが、分子修飾の基質になることを示唆するものであり、このような細胞内外の酵素反応に共役して生成するポリアミン修飾分子が、ポリアミン作用に関与す

る可能性があるものと考えた。すなわち、これまで重要な研究対象とはなっていないポリアミン修飾分子の存在とその重要性を評価する必要があるものと考え、本研究計画を着想するに至ったものである。

2. 研究の目的

ポリアミン分子の特異的な作用の解明を目指して、これまで系統的な研究が行われていないポリアミンによる分子修飾に焦点を当て、ポリアミンによる修飾分子の探索およびその機能解明を試みる。

第一の目的として、ポリアミン修飾分子の検出方法の開発にあたり、スペルミン修飾分子の選択的抽出および同定法を確立する。

第二の目的として、ポリアミン修飾反応の探索において、まず、アルキルアミン修飾が予想される酵素反応(プロテアーゼ、リパーゼ、転移反応など)について、試験管内においてポリアミン修飾反応が進行することを明らかにする。そして、開発した方法論を腸管などの組織、および培養細胞に適用し、スペルミン修飾ペプチド、スペルミン修飾脂質の存在と構造を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) モデルポリアミン修飾分子の選択的抽出と同定のための方法論の開発

ポリアミンは、選択的に検出が容易な官能基を有しないため、修飾分子の検出には、蛍光モデルポリアミンの使用を計画し、モデルポリアミンとしては、既に当研究室において修飾ペプチドの検出において有用であることが明らかになっているピリジルプトレシン(PyPut)(Ito et al., *Biol. Pharm. Bull.* (2007) 30, 1838)を用いる。ピリジルアミノ基は蛍光検出が容易であるばかりでなく、他の蛍光基と異なりMALDI-TOF-MSの励起レーザー光の波長の照射によっても比較的安定でありMALDI-TOF-MSによる構造解析には非常に有利な蛍光標識基である。

PyPut修飾ペプチドのHPLCによる分離、MALDI-TOF-MSによる検出同定方法は既に

確立しており、本研究では、ポリアミン修飾脂質を検討するために、PyPut 修飾脂質の HPLC 分離と LC-MS による検出条件を確立する。

(2) リパーゼおよび N-アシル基転位酵素によるポリアミン修飾反応の確認

ポリアミン修飾脂質の生成の可能性を探るために、リパーゼおよび N-アシル基転位酵素を対象として、試験管内における PyPut 修飾分子の生成を検討する。また、修飾分子の生成を確認した際には、スペルミン修飾について検討する。生成物の確認は、ダンシル化した後、HPLC による検出によって行う。

(3) ポリアミン修飾脂質の合成

脂肪酸の酸クロリドを調製し、PyPut あるいは遊離のアミノ基を一つもつ BOC 保護のポリアミンを反応させることで、ポリアミン修飾脂質を系統的に合成する。

(4) ポリアミン修飾脂質の作用の検討

平成 21 年度の研究で合成するポリアミン修飾脂質について、ラット腸管ループを用いて、腸管における高分子吸収への影響を調べる。

4. 研究成果

(1) ポリアミンの分子修飾の可能性の探索および (2) 分子修飾ポリアミンの水溶性高分子モデル化合物の腸管吸収への影響について検討した。

(1) ポリアミンの分子修飾の可能性の探索

ポリアミンが修飾される可能性を探るために、細胞内反応の N-acyltransferase (NAT) に着目した。NAT は細胞膜のリン脂質であるホスファチジルコリンの sn-1 位の脂肪酸残基をホスファチジルエタノールアミンのアミノ基に転移する酵素である。この転移反応の際にアミンが共存した場合、アミンへのアシル基転移化合物が生成するかどうか実験した結果、NAT による細胞膜リン脂質間のアシル基転移反応の際、共存する生体アミンへの転移反応が副次的に進行する可能性が示された。

(2) 分子修飾ポリアミンの水溶性高分子モデル化合物の腸管吸収への影響

ポリアミンによる腸管吸収促進作用機構を解明するために、水溶性高分子モデル化合物の腸管吸収への影響を検討した。さまざま

なポリアミン類縁体を合成し、ポリアミンの鎖長及び電荷数が腸管吸収に及ぼす影響を調べたところ、スペルミン (spm) の腸管吸収促進作用には、メチレン鎖長よりも電価による影響が大きい可能性がわかった。アシルスペルミン (Acylspm) による腸管吸収への影響を検討した結果、脂肪酸の炭素鎖が長いもので、投与直後より顕著な吸収促進がみられ、その作用は spm より強いことが明らかになった。これは Acylspm の疎水性部分が小腸上皮への到達を早めた可能性や Acylspm がミセル形成するなど、spm とは異なるメカニズムで吸収促進作用を発現している可能性が考えられた。

以上の結果からポリアミンが分子修飾される可能性が示され、分子修飾ポリアミンが化合物の腸管吸収に影響を与えることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) Ikumi Ishii, Yoshihiko Ikeguchi, Hiroshi Mano, Masahiro Wada, Anthony E. Pegg, Akira Shirahata, Polyamine metabolism is involved in adipogenesis of 3T3-L1 cells, *Amino Acids*, 査読有, 42, 2012, 619-626. DOI:10.1007/s00726-011-1037-5
- (2) Yoshiaki Sugita, Koichi Takao, Yoshihiko Sugino, Ryoko Kuwabara, Akira Shirahata, Enhancement of gastrointestinal absorption of ovalbumin caused by spermine induces an increase in plasma histamine levels in mice sensitized to ovalbumin. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 34, 2011, 425-429. DOI:10.1248/bpb.34.415
- (3) Koichi Takao, Akira Shirahata, Fluorescent substrates for polyamine catabolic enzymes and transport. *Methods Mol. Biol.*, 査読有, 720, 2011, 463-474. DOI:10.1007/978-1-61779-034-8_30
- (4) Makiko Wada, Akira Shirahata, Conformational stabilization of rat s-adenosylmethionine decarboxylase by putrescine. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有,

- 33, 2010, 1800-1805.
DOI:10.1248/bpb.33.1800
- (5) Koichi Takao, Yoshiaki Sugita, Akira Shirahata, Assay of N1-acetylpolyamine oxidase activity with N1,N11-didansylspermine as the substrate by ion-pair reversed phase high performance liquid chromatography. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 33, 2010, 1089-1094.
DOI:10.1248/bpb.33.1089
- (6) Makiko Wada, Akira Shirahata, Identification of the primary structure and post-translational modification of rat S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 33, 2010, 891-894.
DOI:10.1248/bpb.33.891
- (7) Koichi Takao, Yoshiaki Sugita, Akira Shirahata, Evaluation method for polyamine uptake by N (1)-dansylspermine, *Amino Acid*, 査読有, 38, 2010, 533-539.
DOI:10.1007/s00726-009-0414-9
- (8) Koichi Takao, Satoko Shibata, Tomohiro Ozawa, Makiko Wada, Yoshiaki Sugita, Keijiro Samejima, and Akira Shirahata, A conceptual model of the polyamine binding site of N1-acetylpolyamine oxidase developed from a study of polyamine derivatives. *Amino Acids*, 査読有, 37, 2009, 401-405.
DOI:10.1007/s00726-008-0168-9

[学会発表] (計 22 件)

- (1) Ayasa Tajima, Yoshihiko Ikeguchi, Mami Saita, Sachie Nakatani, Eri Arikawa-Hirasawa, Muneaki Ishijima, Anthony E. Pegg, Masahiro Wada, Hiroshi Mano and Akira Shirahata, Histochemistry study on aberrant metabolism in bone and chondrocyte of a spermine-deficient Gy mouse. 2011 Gordon Research Conference on Polyamines, 2011 年 6 月、米国
- (2) Yoshihiko Ikeguchi, Masaki Sugawara, Motoki Takaku, Kenichi Yamazaki, Anthony

- E. Pegg, Hitoshi Kurumizaka, Akira Shirahata, Electrophoresis analysis for the enhancement in DNA strand-exchange activity of Rad51 by polyamines. 2011 Gordon Research Conference on Polyamines, 2011 年 6 月、米国
- (3) 山寄健一、池口文彦、丹波卓也、白幡 晶、エテノ蛍光誘導体化法を用いる S-アデノシルメチオニン脱炭酸化酵素活性測定法の生体試料への応用、日本薬学会 第 131 年会、2011 年 3 月、静岡
- (4) 菅原将希、池口文彦、神沼路子、山寄健一、高久誉大、胡桃坂仁 1、白幡 晶、電気泳動によるスペルミンの遺伝子相同組換えに及ぼす影響の解析、日本薬学会 第 131 年会、2011 年 3 月、静岡
- (5) 田島彩沙、池口文彦、齋田麻実、中谷祥恵、平澤恵理、石島旨章、和田政裕、真野 博、白幡 晶、スペルミン合成酵素遺伝子改変マウスにおける骨代謝・軟骨代謝異常の解析、日本薬学会 第 131 年会、2011 年 3 月、静岡
- (6) 片倉美佳、下川宗也、岩城孝宏、石井育美、山寄健一、池口文彦、白幡 晶、マウス及び HepG2 細胞を用いる肝臓における脂質蓄積に及ぼすポリアミンの影響、日本薬学会 第 131 年会、2011 年 3 月、静岡
- (7) 山寄健一、池口文彦、丹波卓也、A. E. Pegg、白幡 晶、エテノ蛍光誘導体化法を用いる S-アデノシルメチオニン脱炭酸化酵素活性測定法の開発、日本ポリアミン学会 第 2 回年会、2011 年 1 月、宇都宮
- (8) Yoshihiko Ikeguchi, Michiko Kanuma, Ikumi Ishii, Sachiko Takahashi, Kenichi Yamazaki, Anthony E. Pegg and Akira Shirahata, Spermine synthase interacts with Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and regulates its activity, 2010 INTERNATIONAL POLYAMINE CONFERENCE, 2010 年 6 月、御殿
- (9) 上杉粹世、石井育美、坂口花織、山寄健一、池口文彦、白幡 晶、筋肉細胞におけるポリアミンの脂質蓄積に及ぼす影響、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月、岡山

- (10) 山寄健一, 丹波卓也, 池口文彦, 白幡 晶, エテノ蛍光誘導体化法を用いる S-アデノシルメチオニン脱炭酸化酵素活性測定法の開発、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- (11) 渡邊 巧, 池口文彦, 山寄健一, 五十嵐一衛, 白幡 晶、疎水性化合物のスペルミン酸化酵素活性に及ぼす影響、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- (12) 岩城孝宏, 石井育美, 山寄健一, 池口彦, 白幡 晶、HepG2 細胞における脂質蓄積に及ぼすポリアミンの影響、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- (13) 神沼路子, 池口文彦, 高橋幸子, 山寄健一, 白幡 晶、Spermine Synthase と Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase との相互作用解析、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- (14) 橋本 崇, 池口文彦, 山寄健一, 藤堂浩明, 杉林堅次, 白幡 晶、ヒト皮膚線維芽細胞におけるポリアミンの薬物取り込みに及ぼす影響、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- (15) 猿谷幸展, 田代大介, 池口文彦, 田中亨, 山寄健一, 岡崎真理, 谷 覺, 日比野康英, 白幡 晶、ポリアミンの神経細胞モデル PC12 の分化および細胞応答に及ぼす影響、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- (16) 山口直紀, 住吉 亜由里, 上田登茂子, 山寄健一, 池口文彦, 白幡 晶、SH 標識量に基づくタンパク質のコンホメーション変化の MALDI-TOF MS 検出法、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- (17) 日下部真彦, 池口文彦, 金子宜令, 渡邊亮介, 山寄健一, 五十嵐一衛, 白幡 晶、蛍光基質を用いる HPLC 法によるデオキシハイプシン合成酵素活性測定法の開発と応用、日本薬学会 第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- (18) 岩城孝宏, 石井育美, 山寄健一, 池口文彦, 白幡 晶、HepG2 細胞の脂質蓄積におけるポリアミンの役割の解明、第 53 回日本薬学会関東支部会、2009 年 10 月、埼玉
- (19) 神沼路子, 池口文彦, 高橋幸子, 山寄健一, 白幡 晶、Spermine Synthase と相互作用を示すタンパク質の探索、第 3 回トランスグルタミナーゼ研究会 & ポリアミン研究会合同学術集会 (同時開催) 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月、神戸
- (20) 石井育美, 池口文彦, 山寄健一, 和田政裕, 真野 博, 白幡 晶、ポリアミン合成酵素阻害剤による脂質代謝への影響、第 3 回トランスグルタミナーゼ研究会 & ポリアミン研究会合同学術集会 (同時開催) 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月、神戸
- (21) Ikeguchi, Y., Tashiro, D., Okazaki, M., Tani, S., Tanaka T., Hibino, Y. and Shirahata, A., Polyamine analogs affect neurite outgrowth and cellular response of PC12 cells, Gordon Research Conference on Polyamines 2009, 2009 年 6 月、米国
- (22) Ishii, I., Ikeguchi, Y., Yamazaki, K., Wada, M., Mano, H., Pegg, A.E. and Shirahata, A., Effect of Polyamine Synthase Inhibitor on Adipogenesis of 3T3-L1 cells, 2009 Gordon Research Seminar on Polyamines 及び Gordon Research Conference on Polyamines, 2009 年 6 月、米国

[その他]

ホームページ等

http://www.josai.ac.jp/~facpharm/nourish/yv/laboratory_of_cellular_physiology.html

http://www.josai.ac.jp/~facpharm/pharma6/yy/bio-analytical_chemistry.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白幡 晶 (SHIRAHATA AKIRA)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：50150107